

氏 名 やまぐち てつじ
山口 哲司

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 187 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学 位 論 文 題 目 p75 neurotrophin receptor expression is a characteristic of the
mitotically quiescent cancer stem cell population present in
esophageal squamous cell carcinoma
(食道扁平上皮癌の静止期癌幹細胞同定における p75 neurotrophin
receptor の有用性)

論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	森 寿
(副査)	教 授	井村 穰二
(副査)	教 授	齋藤 滋
(副査)	教 授	林 篤志
(指導教員)	教 授	塚田 一博

論文内容の要旨

<目的>

細胞分裂の静止期にある癌幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) が、治療抵抗性を有し、またより高い転移能をもつ表現型であると報告されている。我々の研究の目的は、食道扁平上皮癌 (Esophageal squamous cell carcinoma; ESCC) における、静止期癌幹細胞を、CSC マーカーとして報告されている p75 ニューロトロフィン受容体 (p75 neurotrophin receptor; p75NTR)、CD44、CD90 の細胞表面での発現に基づき同定する方法を見つけ出すことである。

<方法並びに成績>

外科的に切除された 56 症例の ESCC 標本を Cancer stem cell マーカーおよび Ki-67 で 2 重染色することにより、p75NTR 陰性細胞にくらべ p75NTR 陽性細胞がより増殖期にある割合が低いことが分かった。次に、ESCC 細胞株 (KYSE 細胞) から、p75NTR および CD44、CD90 の発現をもとに分離した細胞集団を用いて実験を行った。幹細胞関連遺伝子 (Nanog、p63、Bmi1) や上皮間葉転換関連遺伝子 (N-cadherin, fibronectin) の発現レベルを、Real time PCR により解析すると、CD44 陽性または CD90 陽性細胞よりも、それらの発現にかかわらず p75NTR 陽性細胞で有意に遺伝子発現が高いことが分かった。さらに、p75NTR 陽性細胞集団は、CD44 陽性または CD90 陽性細胞集団に比べ、in vitro で有意に高いコロニー形成を有し、マウスへの細胞移植によっても有意に高い腫瘍形成能を示した。さらに、抗癌剤に対する抵抗性を MTT 試験により解析すると、p75NTR 陽性細胞は、シスプラチンに対し有意に高い抵抗性を示した。また、培養細胞株において、p75NTR-陽性/CD44 陰性および p75NTR-陽性/CD90 陰性 KYSE 細胞は、静止期にある細胞が有意に高い比率で含まれていた。

<総括>

これらの結果から、食道扁平上皮癌において、p75NTR 発現に基づいて、より癌幹細胞様特性が高くさらに静止期にある細胞を多く含む細胞集団を特定することで、癌幹細胞集団を分離することができることを示唆する。そして、この結果が研究者に新しい診断および治療における標的を提供することとなると思われる。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

<目的>

細胞分裂の静止期にある癌幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) は、治療抵抗性を有し、またより高い転移能をもつ表現型であると報告されている。本研究で、山口哲司氏は、食道扁平上皮癌 (Esophageal squamous cell carcinoma; ESCC) の静止期癌幹細胞を、CSCマーカーとして報告されているp75ニューロトロフィン受容体 (p75 neurotrophin receptor; p75NTR)、CD44、CD90の発現を基に特定する方法を開発する目的で、外科的切除標本ならびにESCC由来培養細胞株を用いて研究を行った。

<方法並びに成績>

- 1) 外科的に切除された 56 症例の ESCC 標本を、CSC マーカー (p75NTR, CD44, CD90)、および細胞増殖マーカー (Ki-67) とで 2 重免疫組織染色すると、大半の p75NTR 陽性細胞は腫瘍の浸潤部に最も近い数層に分布し、細胞周期の休止期であることが明らかになった。
- 2) ESCC 由来細胞株 (KYSE 細胞株) から、p75NTR、CD44、CD90 の発現をもとに分離した細胞集団を用いて、幹細胞関連遺伝子 (Nanog、p63、Bmi1) や上皮間葉転換関連遺伝子 (N-cadherin, fibronectin) の発現レベルを、Real-time PCR により解析すると、CD44 陽性または CD90 陽性細胞よりも p75NTR 陽性細胞でこれらの遺伝子発現が有意に高いことが分かった。
- 3) Flow cytometry を用いた KYSE 細胞株の細胞周期解析により、p75NTR 陽性細胞集団は、p75NTR 陰性細胞集団に比べ、比較的静止期にある細胞を多く含むことが明らかになった。
- 4) シスプラチン (CDDP) に対する薬剤感受性を検討したところ、p75NTR 陽性細胞は p75NTR 陰性細胞集団に比べ、生存率が高かった。
- 5) p75NTR 陽性細胞集団は、CD44 陽性または CD90 陽性細胞集団に比べ、in vitro で有意に高いコロニー形成能を示した。
- 6) マウス皮下に KYSE 細胞株を移植した結果、p75NTR 陽性細胞集団は、CD44 陽性または CD90 陽性細胞集団に比べ、有意に高い腫瘍形成能を示した。

<総括>

本研究で、山口氏は他の癌で報告されている癌幹細胞表面マーカー (p75NTR, CD44, CD90) を、食道扁平上皮癌 (Esophageal squamous cell carcinoma; ESCC) に適用し、ESCCの癌幹細胞集団の同定を試みた。その結果、CD44陽性やCD90陽性の細胞集団と比較して、ESCCのp75NTR陽性細胞集団は、臨床検体の腫瘍の浸潤部に最も近い数層に分布し、細胞周期の休止期の細胞を多く含み、幹細胞マーカー遺伝子発現が高く、シスプラチン抵抗性であり、培養下でのコロニー形成能とマウス皮下移植による腫瘍形成能が高いことを初めて明らかにした。これらの結果から山口氏は、ESCCのp75NTR陽性細胞集団は、休止期癌幹細胞を多く含み、癌幹細胞様特性が高いと結論した。本研究は、ESCCの癌幹

細胞同定のマーカーとしてp75NTRの有用性を示した点に、新規性および医学における学術的重要性がある。今後、ESCCのp75陽性細胞集団から、癌幹細胞をさらに濃縮同定し、その遺伝子発現特性等を明らかにすることで、ESCCの新たな診断法の開発や癌幹細胞の新しい治療標的の同定など臨床的發展性が大いに期待出来ると考えられる。

以上より、本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判定した。